

UDK: 630*811.14:630*176.1 *Quercus* sp.

Merjenje dimenzij trahej hrasta (*Quercus* sp.) na makroskopskem nivoju s sistemom za analizo slike - LUCIA G

*Measuring vessel dimensions in oak wood (*Quercus* sp.) on macroscopic level with image analysis system - LUCIA G*

avtorji: **Maks MERELA**, LIP Radomlje d.d., Pelechova 15, Radomlje in Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Rožna dolina VIII/34, 1000 Ljubljana **Primož OVEN**, **Katarina ČUFAR**, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Rožna dolina VIII/34, 1000 Ljubljana

izvleček/Abstract

Sistem za analizo slike Lucia G smo uporabili za avtomatsko merjenje dimenzij trahej na makroskopskih vzorcih hrastovine (*Quercus* sp.). Predstavljen je problem priprave površine lesa ter zajem in urejanje slike za avtomatsko merjenje premerov, površin in obsegov trahej ranega lesa. Med različnimi načini priprave vzorcev smo najboljše rezultate dobili, ko smo jih zbrusili z brusnim papirjem granulacije 320 in površino obarvali s črnim alkoholnim flomastrom. V traheje smo nato vtrli prah bele krede in sliko posneli z digitalnim fotoaparatom, namerščenim na stereomikroskop ter jo shranili v formatu TIF. Sliko smo obdelali z digitalnimi filtri, jo binarizirali in določili referenčni okvir za merjenje. Rezultati kažejo, da je s programom za analizo slike Lucia G mogoče pri venčastoporoznih vrstah na makroskopskem nivoju z zadovoljivo natančnostjo meriti dimenzije trahej ranega lesa.

System for image analysis Lucia G was used for measuring vessel dimensions of oak wood (*Quercus* sp.) on macroscopic level. We present the problem

of sample preparation as well as capturing and processing of images for automatic measurements of diameters, areas and perimeters of early wood vessels. After testing various methods of sample preparation we found out that the best results were obtained when the samples were sanded with paper of granulation 320 and the surface stained with black alcohol marker. Vessel lumina were then filled with white chalk dust, and finally the images were captured by a digital camera attached to a stereo microscope and saved in TIF format. We improved the images by using digital filters, converted them to binary images and defined measurement frames. The results confirmed that the image analysis system Lucia G enables measurements of early wood vessel dimensions in ring porous species on macroscopic samples with satisfying accuracy.

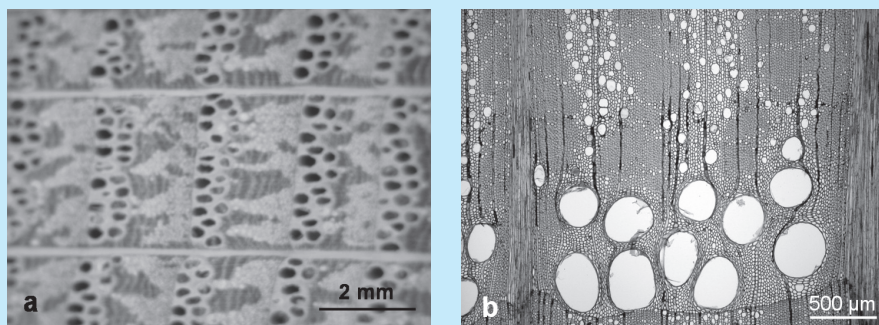
Ključne besede: analiza slike, hrast, *Quercus* sp., les, traheje

Key words: image analysis, oak, *Quercus* sp, wood, vessels

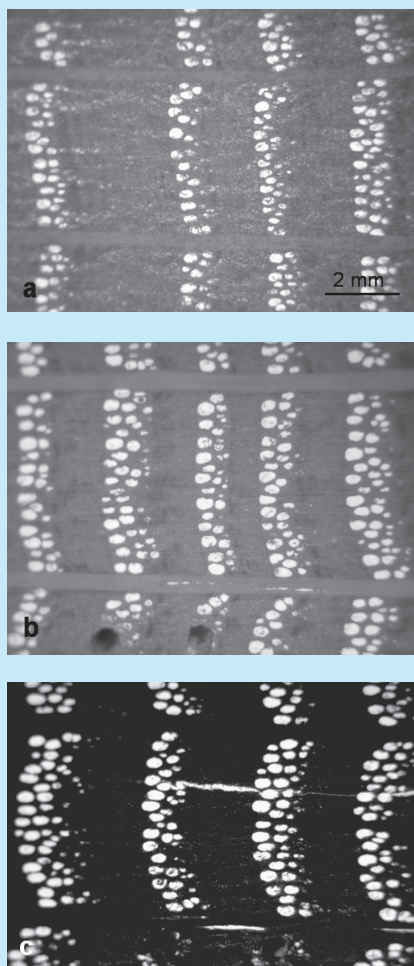
UVOD

Analiza slike je računalniško podprta tehnika, ki omogoča pretvorbo slikovne (vidne) informacije v številske podatke (prim. Levanič, 1999). V anatomiji lesa jo lahko med drugim uporabljamo za merjenje razdalj, dimenzij celic in ugotavljanje deležev celičnih lumnov ter sten na mikroskopskem nivoju. Analiza slike se že več let uspešno uporablja za raziskave lesa iglavcev in listavcev. Tako so npr. raziskovali les vrst *Pinus sylvestris* (Reme in Helle, 2002), *Picea abies* (Spiecker et al., 2000, Reme in Helle, 2002), *Abies alba* (Čufar in Vilhar, 2004), *Fagus sylvatica* (Sass in Eckstein, 1995), *Quercus* sp. (Spiecker et al., 2000, Garcia-Gonzalez in Eckstein, 2003) ter *Castanea sativa* (Fonti in Garcia Gonzalez, 2004).

Danes trg po dostopni ceni ponuja več komercialnih sistemov za analizo slike, vendar še nobeden ni prirejen izključno za specifične potrebe anatomije lesa. V Katedri za tehnologijo lesa uporabljamo sistem Lucia G, ki so ga razvili za raziskave v biologiji, medi-



□ Slika 1. Prečna prereza hrastovine: (a) gladko obdelana površina lesa, kot jo vidimo s stereomikroskopom, (b) posnetek 20 µm debelega anatomskega preparata (*Quercus robur* L.), posnetega s svetlobnim mikroskopom. Zaradi lažje obdelave in analize je slika, zajeta s stereomikroskopom, (a) usmerjena tako, da je rani les na levi strani.



□ Slika 2. Zbrušena prečna površina lesa hrasta (*Quercus sp.*) po obarvanju z: a) toluidin modrim barvilom, b) rdečim in c) črnim alkoholnim flomastrom

cini, kristalografiji itd. Analiza slike vključuje izbiro in pripravo objekta, zajem in obdelavo slike ter merjenje izbranih struktur, ki je lahko polavtomatsko ali avtomatsko. Polavtomatsko merjenje poteka tako, da izmerimo vsak objekt (celico) posebej, za avtomatsko merjenje pa si izberemo določeno površino na sliki in program samodejno izmeri vse objekte, ki so v izbranem območju. Metoda omogoča enostavno in hitro merjenje objektov, kar je bistvena prednost pred zamudnejšim ročnim merjenjem z merilnimi ploščicami. Rezultat analize slike je preglednica s številskimi podatki (prim. Levanič, 1999).

Celice običajno merimo na anatomskih preparatih, ki jih opazujemo s svetlobnim mikroskopom (npr. Zorec, 2004, Čufar in Vilhar, 2004). V tem primeru praviloma pridobimo kvalitetne slike tkiv, pomanjkljiva pa sta zamudna priprava preparatov in relativno majhna površina tkiva za merjenje. Izjemno pomembna je tudi metodologija obdelave slike. Zorec (2004) je raziskoval uporabo digitalnih filtrov programa Lucia G in njihov vpliv na potek in variabilnost meritev, torej na rezultate analize slike. Predlagal je kombinacijo digitalnih filtrov, s kateri-

mi na mikronivoju lahko izboljšamo natančnost meritev.

V pričujoči študiji smo želeli sistem za analizo slike Lucia G uporabiti za merjenje makroskopskih vzorcev hrastovine (*Quercus sp.*). Cilj naloge je predstaviti problematiko priprave površine lesa ter zajema in urejanja slike za avtomatsko merjenje premerov, površin, in obsegov trahej ranega lesa.

MATERIAL IN METODE

PRIPRAVA MATERIALA, ZAJEM IN KALIBRACIJA SLIKE

Za raziskave smo uporabili zračno suhe vzorce hrastovine (*Quercus sp.*). Prečne površine vzorcev smo zbrusili na tračnem brusilnem stroju z brusilnimi papirji granulacije 80, 120, 180, 240 in 320. Na tako pripravljenih površinah je bilo mogoče s stereomikroskopom razločiti vse anatomske strukture: traheje ranega in kasnega lesa, trakove, vlakna, traheide ter aksialni parenhim (slika 1 a), ki jih navadno opazujemo s svetlobnim mikroskopom (slika 1b).

Da bi dosegli večji kontrast med trahejami in preostalim tkivom, smo gladko zbrušeno površino lesa še dodatno obdelali. Obarvali smo jo z barvili, ki jih sicer uporabljamo za barvanje anatomskega preparatov (astra modro, safiranin, fast green in toluidin modro). Poleg tega smo vzorce lesa obarvali tudi z rdečim in črnim flomastrom na alkoholni in vodni osnovi. Po barvanju smo na površino natresli prah bele krede in ga narahlo utrlji v pore. Tako smo dosegli boljši kontrast med belimi, s kredo zapolnjenimi porami, in preostalim temno obarvanim tkivom. Na sliki 2 so prikazani prečni prerezi lesa hrasta, obarvanega z različnimi barvili. Velikost vidnega polja je bila 10,8 x 8,1 mm.

Vzorci smo opazovali s stereomikroskopom Olympus SZ-PT, ki omogoča zvezno spreminjanje povečave. V našem primeru se je izkazal kot najbolj smiseln zajem slike pri najmanjši (6,8 x) povečavi, tako da je bil premer vidnega polja 12 mm. Na ta način smo dosegli dobro ločljivost trahej ranega lesa in dokaj veliko vidno polje. Slike smo zajeli z digitalnim fotoaparatom Nikon Coolpix 995, nameščenim na stereomikroskop.

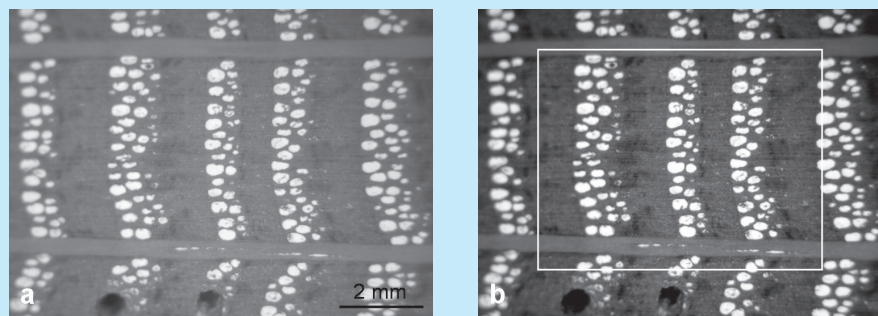
Sliko smo umerili tako, da smo izmerili znano razdaljo med dvema točkama na merilni ploščici, ki smo jo položili na opazovani objekt. Ta podatek smo uporabili za kalibracijo slike, preden smo jo obdelali v programu Lucia G in na njej opravili meritve.

OBDELAVA SLIKE IN MERJENJE

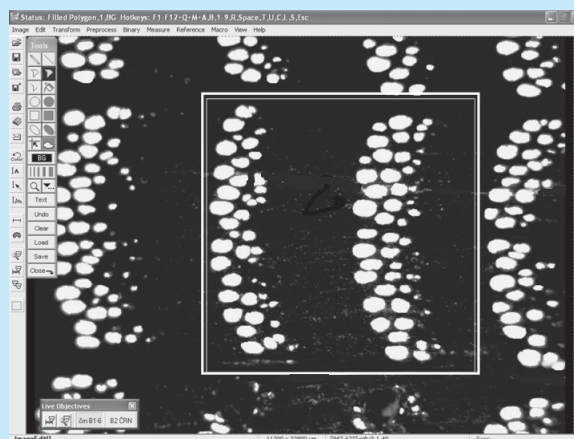
Ker računalniški paket Lucia G podpira večino slikovnih formatov, smo nadaljnje korake obdelave opravili na vzporednih slikah, shranjenih v formatih TIF in JPG. Sliko smo v nadaljevanju obdelali z digitalnimi filtri programa Lucia G. Najprej smo izboljšali kontrast, svetlost in ostrino slike ter intenzivnost barv. Tako smo dosegli največji kontrast ter izostrili meje med trahejami in okoliškim tkivom.

Pri zajemu slike s stereomikroskopom smo opazili, da rob slike ni oster, kar je posledica pomanjkljivosti optike in neravnosti objekta. Ostrina vpliva na natančnost meritev, zato smo za merjenje izbrali le osrednji del slike, označen z okvirom (slika 3b).

V naslednjem koraku smo opravili klasifikacijo oz. binarizacijo slike. To je postopek, ki pretvori strukture na sliki v bele in črne piksele. Ta faza je v analizi slike najpomembnejša, saj določi, kateri pikseli nosijo informacijo (so del struktur, ki jih merimo) in kateri ne (prim. Levanič, 1999). V našem primeru so bili beli pikseli nosilci infor-



□ Slika 3. Zbrušena prečna površina lesa hrasta (*Quercus sp.*) a) neobdelana slika po zajemu in b) slika, obdelana z digitalnimi filtri. Slika je najbolj ostra znotraj okvira.



□ Slika 4. Binarizirana slika prečnega prereza hrasta (*Quercus sp.*). Okvir na sliki prikazuje območje merjenja (rani les dveh branik).

macij (bele traheje), črni pa so del slike, ki ni vključen v merjenje (slika 4). Pred meritvami, ki potekajo samo na binarizirani sliki, smo preverili, če so kot nosilci informacij označene samo strukture, ki jih želimo meriti (lumni trahej ranega lesa). Ker so se belo obarvale tudi razpoke in traheje kasnega lesa, smo opravili popravke z digitalnimi filtri.

Slika 4 prikazuje binarizirano sliko po tem, ko smo jo obdelali z digitalnimi filtri iz menija programa Lucia G.

Meritve so potekale na binarizirani sliki, kjer so bile kot nosilci informacij označene samo strukture, ki smo jih želeli meriti. Področje merjenja smo določili z okvirjem (slika 4). V ta na-

men smo uporabili ukaz View Frame. Okvir lahko nastavimo ročno ali pa ga določimo z ukazom Measurement Frame, kjer vtiskamo natančno pozicijo in dimenzijo področja.

Ko smo na dokončno obdelani sliki določili okvir za merjenje, smo izbrali parametre merjenja na nosilcih informacij (trahejah ranega lesa). Program Lucia G omogoča merjenje kar 44 različnih parametrov. V naši raziskavi smo merili samo premere, obsege in površine lumnov trahej ranega lesa. Poleg merjenih parametrov smo dobili tudi podatek o številu izmerjenih trahej in o površinskem deležu trahej na merjeni površini. Merjenje je potekalo popolnoma avtomatsko. Rezultati so

se izpisali v preglednici, ki smo jo prenesli v program Microsoft Excel za nadaljnjo obdelavo.

Vse uporabljene korake obdelave slike in merjenja smo si na koncu poenostavili s pisanjem "makrov", ki so nam omogočili avtomatsko izvajanje sledja ukazov z določenimi nastavitvami.

REZULTATI IN DISKUSIJA

Pri uporabi različnih načinov za obdelavo površine lesa smo ugotovili, da najboljše rezultate dobimo, če les zbrusimo z brusnim papirjem granulacije vsaj 320. Na ta način smo dobili gladko površino in ostro sliko z razločnimi celicami v lesu. Pregled slik je pokazal, da najboljši kontrast med celičnimi stenami in porami dosežemo z uporabo črnega alkoholnega flomastra, zadovoljiv kontrast pa dobimo tudi z uporabo rdečega flomastra. Barvila, ki se uporabljajo za barvanje anatomskih preparatov, so se izkazala kot manj primerna. Za doseg kontrasta smo morali uporabiti prah bele krede in ga vtreti v pore. Žal je kredo zapolnila tudi razpoke v lesu, kar je motilo nadaljnjo obdelavo slike in merjenje.

Zajem slike smo v našem primeru opravili s stereomikroskopom in digitalnim fotoaparatom ter dobili kvalitetne "statične" slike, ki smo jih pred obdelavo in merjenjem shranili na trdi disk.

Sliko smo zajeli tudi z digitalno kamero in dobili t.i. "živo" sliko. Objekt smo pomikali skozi vidno polje mikroskopa in sproti spremljali sliko površine na monitorju računalnika, pri čemer slike ni bilo treba shraniti. Takoj ko sliko začnemo obdelovati z digitalnimi filtri, postane statična (zamrznjena), da lahko na njej opravimo meritve. Po opravljeni meritvi se lahko vrnemo nazaj na živo sliko in se zopet prestavimo na novo področje merjenja. Metoda "žive" slike s kamero se je izkazala kot

zelo primerna za merjenje večje površine oz. večjega števila branik na istem vzorcu.

Preverili smo tudi možnost zajema slik z optičnimi čitalci (skenerji). Izkazalo se je, da na ta način lahko zajamemo večjo površino lesa. Skeniranje moramo izvesti pri visoki resoluciji (nad 600 dpi). Slika zadovoljive kvalitete je bila zelo velika (več MB), zato sta bila obdelava in merjenje objektov počasnejša.

Med vsemi preverjenimi metodami se je za merjenje dimenzij celic (trahej pri hrastu) izkazala za najprimernejšo metoda zajema slike s stereomikroskopom in digitalnim fotoaparatom, ker so bile tako meje med lumni in celičnimi stenami najbolj jasne in tudi kalibracija slike je bila najbolj natančna.

Med različnimi formati slik, ki smo jih preverili, se je kot najprimernejši izkazal format TIF, ki je na sliki ohranil vse informacije, pomembne za analizo. Preverili smo tudi uporabo formata JPG, kjer se je izkazalo, da je pri shranjevanju slike prišlo do izgube določenih informacij, pomembnih za merjenje oz. nadaljnjo obdelavo slike.

Za avtomatsko merjenje dimenzij je nujna binarizacija slike, kjer določimo delce na sliki, ki so nosilci informacije, in jih želimo izmeriti. V našem primeru je binarizirana slika vsebovala veliko "šumov". To so bili objekti na sliki, ki niso bili nosilci relevantne informacije, a jih je računalniški sistem prepoznal kot takšne (traheje kasnega lesa, aksialni parenhim, razpoke). Večino šumov smo lahko odpravili avtomatsko z digitalnimi filtri. V našem primeru smo najboljše rezultate dobili po uporabi digitalnih filtrov iz menija programa Lucia G: Erode Binary (1,2), Dilate Binary (1,2), Clean Binary (2,2), Close Holes Binary (4,2), Fill Holes, Morpho Separate Objects (15,100). Z uporabo teh filtrov smo s slike prečne

površine hrastovine odstranili traheje kasnega lesa in druge manjše strukture, večje razpoke pa smo odstranili "ročno" z orodjem Image Edit. Slednji omogoča popravljanje slike na podoben način kot programi za risanje, kjer lahko dorišemo in izbrišemo strukture na sliki.

Ko smo sliko dokončno obdelali, smo izmerili premere, obsege in površine lumnov trahej ranega lesa. Po zamudni pripravi objekta, zajemu in binariziranju slike je bilo merjenje opravljeno izredno hitro.

Na sliki 5 prikazujemo primer rezultatov meritev, ki so se izpisali v posebnem okvirčku ob sliki. Ukaz Object Data je odprl pogovorno okno, v katerem so izpisani podatki meritev in osnovna statistika (povprečna vrednost, standardni odklon ter minimalna in maksimalna vrednost). Program Lucia G omogoča tudi izpis grafa frekvenčne porazdelitve, v našem primeru frekvenčne porazdelitve površin lumnov trahej ranega lesa (slika 5). Vse podatke smo za nadaljnjo obdelavo izvozili v program Excel, možen pa je tudi izvoz v druge programe.

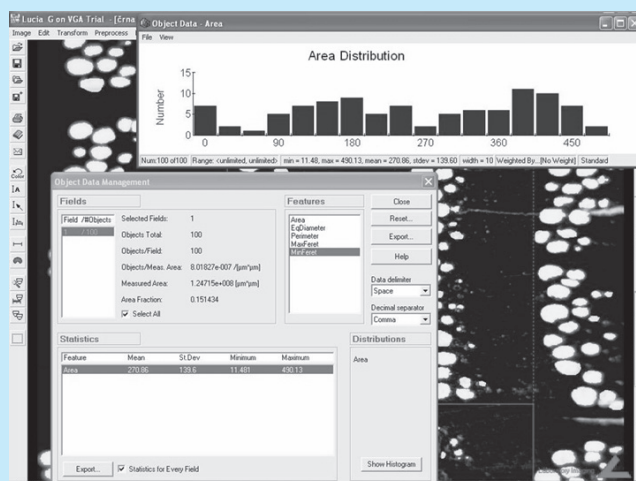
Slika 4 prikazuje rani les dveh branik, kjer smo merili lumne trahej ranega lesa. V preglednici 1 je prikazana osnovna statistika meritev, kjer lahko vidimo, da smo na površini 25 mm² izmerili 92 trahej s povprečnim premerom 233 μm, povprečno površino 50 x 103 μm² in povprečnim obsegom 798 μm. Delež trahej na površini je bil 0,18.

Iz preglednice 1 je razvidno, da smo izmerili traheje ranega lesa premera od 34 do 499 μm. Minimalne dimenzije merjenih objektov nastavljammo s filtrom Clean Noise in očitno smo v našem primeru merili tudi nekaj trahej kasnega lesa. Da bi preverili natančnost meritev, smo svoje rezultate primerjali s podatki iz literature. Wagen-

führ (1996) za dob (*Quercus robur* L.) navaja tangencialni premer trahej ranega lesa od 150 do 350 μm in kasnega lesa od 30 do 140 μm . Grosser (1977) za rani les navaja premere trahej do 400 μm , za kasni les pa med 20 in 30 μm . V študiji, opravljeni na velikem številu branik doba (*Quercus robur* L.), sta Garcia-Gonzales in Eckstein (2003) pri analizi trahej ranega lesa izmerila traheje premera od 80 do 565 μm . Čeprav je bila naša raziskava metodološke narave in meritev nismo ponovili na velikem številu vzorcev, so naše meritve primerljive z navedenimi.

Na osnovi tovrstnih meritev sta Garcia-Gonzales in Eckstein (2003) ugotovila tesno zvezo med količino padavin in površinami trahej ranega lesa v posameznem letu. Podobno sta Fonti in Garcia-Gonzalez (2004) pokazala, da sta število in površina trahej ranega lesa pri domačem kostanju (*Castanea sativa*) v tesni zvezi s temperaturami in padavinami v letu nastanka lesa. Obe študiji sta pripomogli k boljšem razumevanju povezave med anatomsko zgradbo lesa in ekološkimi razmerami, v katerih je drevo raslo, ter nakazujeta, da bo v prihodnje analiza slike še bolj nepogrešljiva v raziskavah lesa.

Naši rezultati kažejo, da je z analizo slike na makroskopskem nivoju, vsaj pri venčastoporoznih vrstah, mogoče dovolj natančno meriti dimenzije trahej ranega lesa. To pravzaprav pomeni, da se za nekatere histometrične analize lesa z opisano pripravo površine lesa lahko izognemo zamudni pripravi anatomskih preparatov. S tem je omogočeno hitro merjenje večjega števila vzorcev pri obsežnejših analizah. Delo s programom Lucia G je mogoče poenostaviti tudi s pisanjem "makrov", ki omogočajo avtomatsko izvajanje sosednja ukazov z določenimi nastavitvami. □



□ Slika 5. Izpis rezultatov meritev in graf frekvenčne porazdelitve

□ Preglednica 1. Rezultati merjenja lumnov trahej ranega lesa dveh zaporednih branik (*Quercus* sp.) - podatki so podani v μm

Number of Fields	1
Number of Objects	92
Objects per Field	92
Measured Area	2,5524e+007 [μm^2]
Objects per Area	3,6078e-006 / [μm^2]
Area Fraction	0,180643

Feature	Mean	St.Dev	Minimum	Maximum
MinFerret	190,5	78,4	34,4	344,4
MaxFerret	300,8	127,1	52,9	498,9
EqDiameter	232,9	98,4	43,0	416,0
Area	50.116,4	34.955,2	1.450,1	135.911,0
Perimeter	797,9	336,6	133,3	1396,9

literatura

- Čufar K., Vilhar B. 2004. Quantitative evaluation of wood anatomy in silver fir (*Abies alba* Mill.) with image analysis. Phytom Horn, (in print).
- Fonti P., Garcia Gonzales I. 2004. Suitability of chestnut earlywood vessel chronologies for ecological studies. New Phytologist, 163:77 - 86.
- Garcia Gonzales I., Eckstein D. 2003. Climatic signal of earlywood vessels of oak on a maritime site. Tree Physiology, 23:497 - 504.
- Grosser D. 1977. Die Hölzer Mitteleuropas. Ein mikrophotographischer Lehratlas. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 208 s.
- Levanič T. 1999. Računalniško podprta analiza slike mikro - in makro objektov. Zbornik gozdarstva in lesarstva, 59: 141 - 167.
- Reme P.A., Helle T. 2002. Assessment of transverse dimensions of wood tracheids using SEM and image analysis. Holz als Roh - und Werkstoff, 60: 277-282.
- Sass U., Eckstein D. 1995. The variability of vessel size in beech (*Fagus sylvatica* L) and its ecophysiological interpretation. Trees - Structure and Function, 9: 247-252.
- Spiecker H., Schinker M.G., Hansen J., Park Y.I., Ebding T., Döll W. 2000. Cell structure in tree rings: novel methods for preparation and image analysis of large cross sections. IAWA Journal, 21: 361-373.
- Wagenführ R. 1996. Holzatlas, Fachbuchverlag, Leipzig, 688 s.
- Zorec A. 2004. Merjenje dimenzij celic lesa s programom za analizo slike. Diplomsko naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo: 59 s.